

③ Offenlegungsschrift
③ DE 198 57 619 A 1

④ Int. CL⁷:
C 12 Q 1/25

④ Aktenzeichen: 198 57 619.6
④ Anmeldetag: 14. 12. 1998
④ Offenlegungstag: 15. 6. 2000

⑦(1) Anmelder:
Bacher, Adelbert, Prof. Dr.med. Dr.rer.nat., 85748
Garching, DE; Zenk, Meinhart H., Prof.Dr., 81243
München, DE

⑦(4) Vertreter:
Wächtershäuser, G., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.,
Pat.-Anw., 80331 München

⑦(2) Erfinder:
Zenk, Meinhart H., Prof. Dr., 81243 München, DE;
Bacher, Adelbert, Prof. Dr.med. Dr.rer.nat., 85748
Garching, DE; Fellermeier, Monika A., 83556
Griesstätt, DE; Kis, Klaus, Dr., 81371 München, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤(4) Verfahren zur Ermittlung von Inhibitoren der Terpenoid-Biosynthese

- ⑤(5) Eine Methode zur Ermittlung von Inhibition wenigstens eines Enzyms in der Biosynthese von Terpenoiden über 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat in Pflanzen, die folgende Schritte umfaßt:
(a) Herstellung einer Suspension aus Zellen oder Plastiden eines plastidhaltigen Organismus in einem Kulturmedium, welches zur Unterstützung des Metabolismus in besagten Zellen oder Plastiden mindestens bis zum Ausmaß des besagten Biosyntheseweges dient,
(b1) Zugabe einer definierten Menge einer ¹³C-, ¹⁴C-, ²H- oder ³H-markierten, biochemischen Vorstufe zur Erzeugung von Terpenen über besagtem Biosyntheseweg,
(c1) Inkubation der in Schritt (b1) erhaltenen Mischung für eine bestimmte Zeitdauer bei einer definierten Temperatur,
(d1) Abtrennung einer Fraktion aus der in Schritt (c1) erhaltenen Mischung, welche ein Produkt oder Zwischenprodukt des besagten Biosyntheseweges unterhalb von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat enthält,
(e1) Nachweis und Bestimmung der Konzentration eines oder mehrerer markierter Produkte in der besagten Fraktion, welche in Schritt (d1) erhalten wurde,
(b2) Wiederholung des Schrittes (b1) nach der Zugabe einer definierten Menge einer chemischen Testsubstanz unter ansonsten identischen Bedingungen,
(c2) bis (e2) Wiederholung der Schritte (c1) bis (e1) mit der in Schritt (b2) erhaltenen Mischung unter denselben Bedingungen wie in den Schritten (c1) bis (e1) und
(f) Nachweis der Hemmung wenigstens eines Enzyms im besagten Biosyntheseweg über die ...

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich allgemein auf das Gebiet der Herbizide und speziell auf eine Methode zur Wachstumshemmung von Pflanzen und auf eine Methode zur Ermittlung von Inhibitoren aus einer chemischen Substanzbibliothek.

In der Vergangenheit wurde Herbizidorschung durchgeführt, indem man chemische Substanzen zuerst direkt auf ihre Hemmeigenschaften für das Pflanzenwachstum untersuchte, und erst viel später wurde der Wirkmechanismus eines in dieser Weise gefundener Herbizids aufgeklärt. Mit einem derartigen Blindprozeß sind die Ergebnisse in hohem Maße vom Zufall abhängig und in starkem Maße unkontrolliert.

Wir waren nun erfolgreich, diesen Prozeß der Entwicklung neuer Herbizide mit bekanntem Wirkmechanismus durch ein rationelles Bestimmungsverfahren für Herbizid-Aktivität umzukehren. Unser Verfahren beruht insbesondere auf der folgenden Vorgehensweise:

Zuerst bestimmen wir allgemeine Eigenschaften, die ein ideales Herbizid besitzen sollte. Diese sind im Einzelnen:

- (1) Ein Herbizid sollte hochwirksam gegen alle Arten von Unkraut sein.
- (2) Es sollte für Menschen und Tiere, die dem Herbizid ausgesetzt sind, nicht toxisch sein.
- (3) Es sollte einen Wirkmechanismus besitzen, der sich zur Produktion von genetisch veränderten Ertragspflanzen mit einer Resistenz gegen das Herbizid anbietet.

Wir konnten diese Problem lösen. Als einen ersten Aspekt unserer Lösung dieses Problems bestimmten wir einen Biosyntheseweg, der ein ideales Ziel für ein Herbizid darstellt: der Terpenoid-Biosyntheseweg über 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat. Dieser Biosyntheseweg wurde in keiner Tierart gefunden. Er ist von entscheidender Bedeutung für erwartet wird, daß sie durch gleichnamige idiosynkratische Enzyme katalysiert werden und daher Kreuzinhibitionen mit anderen Enzymen, insbesondere mit Säugetierenzy men, nicht zu befürchten sind.

Um diesen Aspekt unserer Lösung des obengenannten Problems besser würdigen zu können, werden wir nun den biochemischen Hintergrund dieses Biosyntheseweges näher erläutern.

Durch klassische Untersuchungen von Bloch, Cornforth, Lynen und ihren Mitarbeitern haben sich Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAP) als die Schlüsselverbindungen im Biosyntheseweg der Terpenoide durchgesetzt. Vor kurzem wurde gezeigt, daß in bestimmten Bakterien (Röhrner et al. 1993; Röhrner et al. 1996; Duvold et al. 1997; Sprenger et al. 1997) und Pflanzen (Arigoni et al. 1997) ein alternativer Biosyntheseweg wirksam ist.

Dieser neuartige Biosyntheseweg ist in Abb. 1 dargestellt. Er beginnt mit der Kondensation von Pyruvat mit Glyceraldehyd-3-phosphat unter Bildung von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP), welches scheinbar nachfolgend in einer Zweistufenreaktion, die eine intramolekulare Umlagerung und eine Reduktion beinhaltet, in 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat umgewandelt wird. Diese Zwischenstufe wird nachfolgend in IPP und DMAP umgewandelt.

Im klassischen Biosyntheseweg entsteht IPP und DMAP aus Mevalonat. Es wurde gefunden, daß der alternative Biosyntheseweg in Tieren nicht vorkommt, und daß in Pflanzen der klassische Biosyntheseweg im Zytosol, während der alternative Biosyntheseweg in Plastiden (z. B. Chromoplasten, Chloroplasten) abläuft.

Es wurde weiterhin als Aspekt der Erfindung gezeigt, daß sich dieser alternative Biosyntheseweg mit seinen in starkem Maße idiosynkratischen Reaktionen und Enzymen als ideales Ziel für Herbizide eignet.

Wir haben desweiteren gezeigt, daß chemische Substanzbibliotheken gezielt nach Inhibitoren des alternativen Biosyntheseweges durchsucht werden können. Insbesondere haben wir ein Verfahren entwickelt, mit dem man Inhibition wenigstens eines der Enzyme aus dem Terpenoid-Biosyntheseweg über 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat in Pflanzen ermitteln kann, und das folgende Schritte beinhaltet:

- (a) Herstellung einer Suspension aus Zellen oder Plastiden eines plastidhaltigen Organismus in einem Kulturmedium, welches zur Unterstützung des Metabolismus in besagten Zellen oder Plastiden mindestens bis zum Ausmaß des besagten Biosyntheseweges dient.
- (b1) Zugabe einer definierten Menge einer ^{13}C -, ^{14}C -, ^3H - oder ^5H -markierten, biochemischen Vorstufe zur Erzeugung von Terpenoiden über besagten Biosyntheseweg,
- (c1) Inkubation der in Schritt (b1) erhaltenen Mischung für eine bestimmte Zeitspanne bei einer definierten Temperatur, und
- (d1) Abtrennung einer Fraktion aus der in Schritt (c1) erhaltenen Mischung, welche ein Produkt oder Zwischenprodukt des besagten Biosyntheseweges unterhalb von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat enthält,
- (e1) Nachweis und Bestimmung der Konzentration eines oder mehrerer markierter Produkte in der besagten Fraktion, welche in Schritt (d1) erhalten wurde,
- (b2) Wiederholung des Schrittes (b1) nach der Zugabe einer definierten Menge einer chemischen Testsubstanz unter ansonsten identischen Bedingungen,
- (c2) bis (e2) Wiederholung der Schritte (c1) bis (e1) mit der in Schritt (b2) erhaltenen Mischung unter denselben Bedingungen wie in den Schritten (c1) bis (e1) und
- (f) Nachweis der Hemmung wenigstens eines Enzyms im besagten Biosyntheseweg durch die Beobachtung, ob die Konzentration eines oder mehrerer Produkte, die in Schritt (e1) bestimmt wurde höher ist als die Konzentration eines oder mehrerer Produkte, die in Schritt (e2) bestimmt wurde.

Dieses Verfahren kann entweder mit ganzen Zellen eines plastidhaltigen Organismus oder mit abgetrennten Plastiden ausgeführt werden. In jedem Fall bedeutet die Inkubation mit einer markierten spezifischen Vorstufe im alternativen Biosyntheseweg über 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat, daß das Verfahren nur Enzyme dieses Biosyntheseweges umfaßt. Da dieser Biosyntheseweg in allen Pflanzen gefunden wird, wird jeder Inhibitor die Eigenschaft eines Tottherbizides besitzen.

DE 198 57 619 A1

Das Verfahren kann mit Zellkulturen oder Suspensionen aus Plastiden ausgeführt werden. Beispielsweise kann die Zellkultur von *Catharanthus roseus* verwendet werden. Die Plastiden können Chromoplasten, Chloroplasten, Etiochloroplasten oder Lekytoplasmata sein. Als Ersatz können Cyanobakterien im Hinblick auf ihre Beziehung zu Chloroplasten verwendet werden.

Bevorzugt sind Plastiden aus Unkräutern oder aus Pflanzen, die eine enge Verwandtschaft zu Unkräutern besitzen.

Die Plastiden können aus Pflanzengewebe nach Aufbrechen der Zellen, Filtration und Zentrifugation nach bekannten Methoden erhalten werden, z. B. Camara, Methods Enzymol. 214, 352-365 (1993) oder Lievogel, Cytobiology 12, 155-174 (1975). In diesen Veröffentlichungen sind auch Inkubationsmedien für diese Plastide angegeben.

Die markierten Vorstufen können nicht-radioaktiv oder radioaktiv sein. Im Falle von nichtradioaktiven Vorstufen werden ¹⁴C- oder ³H-markierte Vorstufen bevorzugt. Im Falle radioaktiver Vorstufen werden ¹⁴C- und ³H-markierte Vorstufen bevorzugt. Sie werden als wässrige Lösung zugegeben. Die Konzentration der Vorstufen in wässriger Lösung kann zwischen 1 µM und 1 mM liegen. Die Konzentration der Plastiden entspricht einem Gesamtproteininhalt von 0,1 mg/ml bis zu 10 mg/ml, vorzugsweise 0,2 mg/ml bis zu 5 mg/ml. Im Falle ¹⁴C-markierter Vorstufen liegt die Radionaktivität vorzugsweise bei mindestens 0,1 µCi und im Falle ³H-markierter Vorstufen vorzugsweise bei mindestens 1 µCi.

Die Inkubation wird vorzugsweise bei 20 bis 40°C und insbesondere bei 25 bis 30°C durchgeführt. Die Inkubationszeit kann 30 min bis 15 h, vorzugsweise 2 bis 10 h und insbesondere 6 bis 8 h betragen.

Die Abtrennung der Terpenoidfraktion kann durch Extraktion mit einem lipophilen organischen Lösungsmittel, vorzugsweise Chloroform, Dichlormethan oder Ethylacetat erfolgen. Der Extrakt wird auf ein gewünschtes Volumen z. B. 300 µl eingestellt. Ein Aliquot davon, z. B. 10 µl, wird für Flüssigscintillationszählung verwendet. Das gleiche wird mit der Mischung vor Inkubation gemacht. Der Wert vor Inkubation wird auf 100% gesetzt, und die Werte nach der Inkubation werden in % relativ zum Wert vor der Inkubation angegeben.

Die chemische Testverbindung kann als Feststoff oder als Lösung zugegeben werden. Im Fall einer wasserlöslichen Verbindung wird eine wässrige Lösung bevorzugt. In anderen Fällen kann eine Lösung in hydrophilen, protischen organischen Lösungsmitteln, wie Methanol, Ethanol, Propanol oder hydrophilen, aprotischen organischen Lösungsmitteln, wie Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid, Tetrahydrofuran, Dioxan, Ethylenglykoldimethylether, Diethylenglykoldimethylether, Triethylenglykoldimethylether, Tetraethylenglykoldimethylether oder Hexamethylphosphorsäuretriamid verwendet werden. Als Lösungsmittel können solche Lösungsmittel auch einem Medium für die Suspension der Plastide zugefügt werden.

Als biochemische Vorstufe kann jeder Bestandteil, der sich im Biosyntheseweg über 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat vor Isopentenylpyrophosphat befindet, verwendet werden, oder auch jede der Verbindungen die in vivo in einen solchen Bestandteil umgewandelt werden können. Bevorzugt sind 1-Deoxy-D-xylulose, 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat, 2C-Methyl-D-erythritol, 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat und 2C-Methyl-D-erythritol-4-pyrophosphat.

Jede Verbindung, die als Inhibitor in dem Testverfahren wirkt, ist ein Herbizid. Sie kann für die spezifische Blockierung des Terpenoid-Biosyntheseweges über 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat verwendet werden.

Die Erfindung wird nun mit Bezug auf die Beispiele erklärt.

Beispiele

Herstellungsbeispiel 1

(a) 1,2-O-Isopropyliden-(2R,3RS)-1,2,3-butantriol (8)

1,2:5,6-Di-O,O-isopropyliden-D-mannitol (6) (14 g, 53,4 mmol) wurde in 200 ml trockenem Chloroform gelöst. Wasserfreies Kaliumcarbonat (50,5 g, 366 mmol) wurde zugegeben, und die Suspension wurde auf 0°C gekühlt. Bleitetraacetat (27,1 g, 61,1 mmol) wurde in kleinen Portionen unter starkem Rühren eingetragen. Die orangefarbene Suspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Kaliumcarbonat wurde abgeknuscht, und der Filterkuchen mehrmals mit Ether gewaschen. Das Filtrat und die Waschphase wurden vereinigt, mit Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das zurückbleibende Öl, welches den Isopropylidenglycerinaldehyd enthielt wurde rasch destilliert (60°C bei 30–40 mbar). Ausbeute: 10,5 g (80,7 mmol, 76%) reiner Isopropylidenglycerinaldehyd 7. Dieses Produkt wurde sofort in 35 ml trockenem Ether gelöst, um eine Polymerisation zu verhindern. Die Lösung von 7 wurde zu einer gekühlten Lösung aus Methylmagnesiumjodid in Ether gegeben [hergestellt aus 5,1 g (207 mmol) Magnesium und 13,0 ml (209 mmol) Methyljodid in 140 ml Ether]. Nachdem der Aldehyd komplett zugegeben war, wurde die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Die so erhaltene Lösung wurde anschließend langsam auf zerkleinertes Eis geschüttet, und ausgefallenes Magnesiumhydroxid wurde durch Zugabe einer gesättigten Ammoniumchloridlösung (50 ml) wieder in Lösung gebracht. Die organische Phase wurde abgetrennt, und die wässrige Phase wurde mit Natriumchlorid gesättigt und anschließend mit Chloroform extrahiert (3 × 50 ml). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 9,9 g (67,8 mmol, 82%); 1,2-O-Isopropyliden-(2R,3RS)-1,2,3-butantriol (8).

¹H-NMR (360 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0,96 (d, ¹J = 6,5 Hz), 1,07 (d, ¹J = 6,5 Hz), 1,24 (s), 1,25 (s), 1,29 (s), 1,33 (s), 3,41–3,47 (m), 3,67–3,78 (m), 3,82–3,97 (m), 4,67 (d, ¹J = 4,6 Hz), 4,75 (d, ¹J = 5,2 Hz) (unterstrichene Signale gehören zu dem Diastereomer, welches im Überschuss entsteht); ¹³C-NMR (90 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 18,0, 19,8, 24,8, 26,1, 64,3, 65,9, 66,1, 66,9, 79,1, 79,3, 107,7, 107,7 (unterstrichene Signale gehören zu dem Diastereomer, welches im Überschuss entsteht). Anal. ber. für C₆H₁₂O₄: C 57,5, H 9,9, O 32,6; gef.: C 57,2, H 9,9, O 32,8.

(b) 3,4-O-Isopropyliden-(3R)-3,4-dihydroxy-2-butanon (9)

1,2-O-Isopropyliden-(2R,3RS)-1,2,3-butantriol (8) (0,9 g, 67,8 mmol) wurde in 100 ml Chloroform gelöst. Wasser (100 ml), 30 g Kaliumcarbonat (217 mmol) und 50 mg Rutheniumdioxid-Hydrat wurden zugegeben. Diese Suspension

DE 198 57 619 A1

wurde bei Raumtemperatur gelöst, und 2% g (15 ml) Natriumperiodat wurde in kleinen Portionen zugefügt. Sobald der pH-Wert unter 7 fiel wurde er durch Zugabe von festem Kaliumcarbonat wieder auf einen Wert zwischen 8 und 8.5 eingestellt. Nach Beendigung der Perkolatzugabe ließ man die Suspension zwei weitere Tage bei Raumtemperatur ruhen. Vor der Aufarbeitung wurde ein Aliquat der Reaktionsmischung mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie überprüft. Falls noch Ausgangsmaterial vorhanden war wurde zur Reaktionsmischung eine zusätzliche Menge an Natriumperiodat gegeben. Wenn die Oxidation vollständig abgelaufen war wurde die Suspension abgenascht und das Filtrat wurde in Chlorotriphn extrahiert (4×50 ml). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 7.2 g (50 %mol). ^{13}C : 3,4-O-Isopropyliden- β R-3,4-dihydroxy-2-butanon (91).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.4 (s, NH), 1.5 (s, SH), 2.27 (s, 3H), 4.3 (dd, J = 8.54 Hz, J = 5.50 Hz, 1H), 4.2 (dd, J = 8.54 Hz, J = 7.95 Hz, 1H), 4.41 (dd, J = 7.94 Hz, J = 5.5 Hz, 1H); ¹³C NMR (62 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 25.3 (CH₃), 25.6 (CH₃), 26.3 (CH₃), 66.4 (CH₂), 80.4 (CH), 110.9 (C₂).

(e) 1,2-O-isopropylidene-3-O-trimethylsilyl-(2R,3RS)-1,2,3-trihydroxy-3-exanobutan (10)

3,4-O-Isopropyliden-3R-,3,4-dihydroxy-2-butonen (9) (7,2 g, 50 mmol) wurde in 50 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung wurde eine katalytische Menge Kaliumcyanid (20 mg) und der Kronenether 18-Krone-6 (20 mg) gegeben. Unter Eiskühlung wurden 9,4 ml (70 mmol) Trimethylsilylcyanid innerhalb 20 Minuten zugeopt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Trimethylsilylcyanid wurden unter reduziertem Druck entfernt. Der orangefarbene feste Rückstand (12,0 g, 49,3 mmol, 99%) enthielt eine Mischung der Erythro- und Threoverbindung in einem Verhältnis von 3 : 1, der darüber hinaus keine nennenswerten Mengen anderer Produkte enthielt.

(d) 2C'-Methyl-D-erythro-1,4-lacton (12) und 2C'-Methyl-D-threono-1,4-lacton (13)

1,2-O-Isopropyliden-3-O-trimethylsilyl-(2R,3RS)-1,2,3-trihydroxy-3-cyanobutan (10) (12.0 g, 49.3 nmol) wurde in 30 ml 25%iger Salzsäure suspendiert. Zur Verbesserung der Löslichkeit des lipophilen Cyanhydrins wurde Ethanol (10 ml) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 45°C 30 Minuten lang gerührt und anschließend 3 Stunden lang am Rückfluß gekocht. Die Mischung färbte sich braun, und ein Niederschlag aus Ammoniumchlorid setzte sich ab. Anschließend wurde die Säure mit konzentrierter Ammoniaklösung neutralisiert, und die Mischung wurde zur Trockene eingeengt. Der Kristallbrei wurde danach mit Methanol digeriert, und unlösliches Ammoniumchlorid wurde abfiltriert. Das Methanol wurde im Vakuum entfernt. Das zurückbleibende Öl enthielt die Lactone 12 und 13, sowie die offenkettigen Carbonsäuren (11). Die Lactonisierung wurde durch Kochen mit 60%iger Ameisensäure (30 ml) für 2 Stunden vervollständigt. Sehald keine offenkettigen Carbonsäuren in der Mischung mehr nachweisbar waren, wurde die Lösung unter reduziertem Druck aufkonzentriert. Das zurückbleibende Öl wurde in einer Mischung aus Ethylacetat, 2-Propanol und Wasser (5 ml, 65/24/12, v/v/v) geöst. Diese Lösung wurde auf eine Kieselgelsäule gegeben (saure Form) und wurde mit der Mischung aus Ethylacetat/2-Propanol/Wasser eluiert. Produkthaltige Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde lyophilisiert. Das zurückbleibende Öl (5,9 g, 44,7 nmol, 91 %) enthielt nach NMR-spektroskopischer Analyse 2C-Methyl-D-erythro-1,4-lacton und 2C-Methyl-D-threono-1,4-lacton in einem Verhältnis von 3 : 1.

¹H NMR (250 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 1.30 (s, 3H), 3.92 (dd, ²J = 4.27 Hz, ³J = 9.16 Hz, 1H), 4.13 (dd, ²J = 4.27 Hz, ³J = 5.50 Hz, 1H), 4.44 (dd, ²J = 5.50 Hz, ³J = 9.15 Hz, 1H); ¹³C NMR (63 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 17.9 (CH₃), 73.1 (CH₂), 78.8 (CH), 85.8 (C_q), 161.8 (C_q); IR (Film): 1770 cm⁻¹; Anal. ber. für C₅H₈O₄; C 45.4, H 6.0, 48.3; geL: C 46.2, H 6.5, O 47.3.

2C-Methyl-D-erythro-1,4-lacton: ^1H NMR (250 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 1.33 (s, 3H), 4.00 (dd, $^2\text{J} = 1.83$ Hz, $^3\text{J} = 4.27$ Hz, 1H), 4.09 (dd, $^2\text{J} = 1.83$ Hz, $^3\text{J} = 9.77$ Hz, 1H), 4.38 (dd, $^2\text{J} = 4.27$ Hz, $^3\text{J} = 10.38$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (63 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 21.9 (CH₃), 73.6 (CH₂), 75.0 (CH), 75.8 (C₅), 164.9 (C₄); IR (Film): 1770 cm⁻¹. Offenkettige Carbonsäuren (Isomerenmischung 1 : 1): ^1H NMR (250 MHz, D₂O): δ (ppm) 1.14 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 3.45–3.85 (m, 6H); ^{13}C NMR (63 MHz, D₂O): δ (ppm) 19.8 (CH₃), 20.7 (CH₂), 64.9 (CH₂), 65.2 (CH₂), 70.1 (CH), 70.3 (CH), 77.8 (C₅), 77.9 (C₄), 182.5 (C₆), 182.8 (C₅).

(e) 2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythro-1,4-lacton (14)

Wasserfreies Zinkchlorid (14.1 g, 103 mmol) wurde in 100 ml Aceton gelöst. Die Lösung wurde mit Eis gekühlt, und 5.9 g einer Mischung aus 2C-Methyl-D-erythro-1,4-lacton (12) (33.5 mmol) und 2C-Methyl-D-threono-1,4-lacton (13) (11.2 mmol) gelöst in 13 ml Aceton wurde zugegeben. Nach 18 Stunden wurde die Lösung durch Zugabe von 150 ml Chloroform verdünnt. Zinkchlorid und unverändertes 2C-Methyl-D-threono-1,4-lacton wurden durch Waschen mit Wasser (3×100 ml) entfernt. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wurde unter reduzierendem Druck entfernt. Ausbeute: reines 2,3-O-Isopropyliden-2C'-methyl-D-erythrono-1,4-lactone (4.4 g, 25.0 mmol, 76% ausgehend von 2C-Methyl-D-erythro-1,4-lacton) in Form eines farblosen Oles, welches bei -20°C kristallisierte.

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.33 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.48 (s, 3H), 4.24 (dc, ¹J = 3.54 Hz, ²J = 11.06 Hz, 1H), 4.34 (dc, ¹J = 11.06 Hz, ²J = 0 Hz, 1H), 4.41 (dc, ¹J = 3.50 Hz, ²J = 0 Hz, 1H); ¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 18.4 (CH₃), 26.5 (CH₃), 26.9 (CH₃), 58.9 (CH₂), 80.3 (CH), 81.4 (C), 113.0 (C), 176.7 (C).

DE 198 57 619 A 1

(f) 2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythrofuranose 15

2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythronate (14) (2,2 g, 12,9 mmol) wurde in 50 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Die Mischung wurde unter Stickstoff auf -78 °C gekühlt. Anschließend wurde eine Lösung aus Disobutylaluminiumhydrid (1 M in Hexan, 17 ml, 17 mmol) langsam zugeropft. Die Lösung ließ man im Kühlfad über Nacht stehen. Nasser Ether (180 ml) und passiertes Kieselgel (30 g) wurden zugefügt. Die Mischung wurde 1 Stunde geruhrt, danach auf Raumtemperatur erwärmt und dann filtriert. Die Lösung wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das zurückbleibende Öl wurde durch Chromatographie an Kieselgel mit einer Mischung aus Hexan/Ethylacetat (1/2, v/v) gereinigt. Ausbeute: 2,0 g (11,5 mmol, 89%) 2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythrofuranose als anionäre Mischung ($\alpha\beta = 1/1$). ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,29 (s), 1,30 (s), 1,34 (s), 1,35 (s), 1,37 (s) (18 H), 3,46 (dd, ³J = 3,54 Hz, ²J = 11,06 Hz, 1H), 3,55 (m, 1H), 3,78 (d, ²J = 11,50 Hz, ²H), 3,84 (d, ²J = 11,06 Hz, 1H), 3,97 (dd, ³J = 3,80 Hz, ²J = 11,06 Hz, 1H), 4,29 (dd, ³J = 3,10 Hz, ²J = 8,85 Hz, ²H), 4,52 (d, ²J = 11,06 Hz, 1H), 5,13 (d, ²J = 2,65 Hz, 1H); ¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 19,4 (CH₃), 21,4 (CH₃), 26,3 (CH₃), 26,9 (CH₃), 27,2 (CH₃), 28,0 (CH₃), 67,1 (CH₃), 71,5 (CH₂), 84,9 (CH₂), 86,0 (C_q), 86,1 (CH₂), 91,4 (C_q), 101,4 (C_q), 103,3 (C_q), 112,4 (CH₂), 112,9 (CH₂).

(g) 2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythrose-(O-benzyl)oxim (18)

2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythronose (15) (0,5 g, 2,87 mmol) wurde in 12 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Trockenes Pyridin (1 ml) und 0,88 g (5,5 mmol) O-Benzylhydroxylaminhydrochlorid wurde auf ein Mal zugegeben. Das Hydroxylamin löste sich innerhalb von 20 Minuten auf, und die Reaktionsmischung wurde nach 40 Minuten beobachtet. Die Mischung wurde 15 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus Chloroform/Ethylacetat (1/4, v/v, 1 ml) suspendiert. Die Suspension wurde auf eine Kieselgelsäule (1 cm × 30 cm) aufgetragen, und das Produkt wurde mit der Lösungsmittelsuspension eluiert. Produkthaltige Fraktionen wurden vereinigt, und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck eluiert. Ausbeute: 0,53 g (1,9 mmol, 66%) 2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythrose-(O-benzyl)oxim (18) als farbloses Öl. ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,26 (s, 3H), 1,31 (s, 3H), 1,33 (s, 3H), 3,42–3,56 (m, 2H), 3,86 (dd, ³J = 4,89 Hz, ²J = 6,72 Hz, 1H), 4,92 (s, 2H), 7,15–7,25 (m, 5H), 7,32 (s, 1H); ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 22,8 (CH₃), 26,6 (CH₃), 27,9 (CH₃), 64,7 (CH₂), 76,0 (CH₂), 80,5 (CH), 84,3 (C_q), 109,4 (C_q), 127,9 (CH), 128,2 (CH), 128,3 (CH), 137,2 (C_q), 152,0 (CH).

(h) 2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythrose-(O-benzyl)oxim-4-dibenzylphosphat (19)

Tribenzylphosphit (1,3 g, 3,7 mmol) wurde in 20 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde auf -20°C gekühlt. Jod (0,96 g, 3,8 mmol) wurde in einer Portion zugegeben. Die Lösung wurde lichtgeschützt auf Raumtemperatur erwärmt, sobald die violette Farbe der Lösung verschwunden war. 2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythrose-(O-benzyl)oxim (18) (0,53 g, 1,9 mmol) wurde in 20 ml Dichlormethan gelöst und 2,5 ml Pyridin (31,5 nmol) wurde zugegeben. Die Lösung wurde auf -20°C gekühlt und die Lösung des Dibenzyljodophosphates wurde langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und wurde anschließend nacheinander mit Natriumhydrogensulfat (30%, w/v, 2 × 10 ml), einer Lösung aus Natriumhydrogencarbonat (5%, w/v, 10 ml), und Wasser (10 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend unter reduziertem Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus Hexan/Ethylacetat (3/1, v/v, 2 ml) suspendiert. Diese Mischung wurde auf eine Kieselgelsäule (1 cm × 20 cm) aufgetragen und mit Hexan/Ethylacetat (3/1, v/v) solange eluiert, bis das Benzyljodid vollständig ausgewaschen war. Das Produkt wurde danach mit einer Mischung aus Chloroform/Ethylacetat (1/4, v/v) eluiert. Produkthaltige Fraktionen wurden vereinigt, und das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Ausbeute: 0,73 g (1,35 mmol, 71%) 2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythrose-(O-benzyl)oxim-4-dibenzylphosphat (19).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,31 (s, 3H), 1,37 (s, 3H), 1,39 (s, 3H), 3,90–3,99 (m, 3H), 4,94 (s, 1H), 4,97–5,02 (m, 6H), 7,24–7,33 (m, 15H); ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 22,0 (CH₃), 26,6 (CH₃), 28,0 (CH₃), 65,3 (d, ²J_{CP} = 5,5 Hz, CH₂), 69,1–69,5 (m, CH₂), 76,2 (CH₂), 80,2 (C_q), 82,5 (d, ²J_{CP} = 7,9 Hz, CH), 109,7 (C_q), 127,9–128,5 (CH), 135,6 (d, ²J_{CP} = 6,8 Hz, C_q), 137,9 (C_q), 150,3 (CH); ³¹P NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -0,8 (s).

(i) 2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythrose-4-dibenzylphosphat (20)

2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythrose-(O-benzyl)oxim-4-dibenzylphosphat (19) (0,26 g, 0,43 mmol) wurde in 15 ml Dichlormethan gelöst, welches 2 ml Pyridin enthielt. Die Lösung wurde auf -78°C gekühlt und wurde 7 Minuten lang mit einem Ozondurchfluß von ungefähr 3 g/min (0,44 mmol) ozonisiert. Anschließend wurde Stickstoff durch die blaue Lösung geleitet. Sobald die blaue Farbe verschwunden war, wurden 2 ml Dimethylsulfid zugegeben. Die Mischung ließ man noch 1 Stunde bei -78°C stehen und ließ sie dann auf Raumtemperatur erwärmen. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt, und das Rohprodukt wurde chromatographisch gereinigt (Kieselgur, Chloroform/Ethylacetat 1/4, v/v). Ausbeute: 0,17 g (0,39 nmol, 81%) reiner Aldehyd. ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,24 (s, 3H), 1,36 (s, 3H), 1,46 (s, 3H), 3,93–4,02 (m, 2H), 4,05–4,13 (m, 1H), 4,92–5,00 (m, 4H), 7,23–7,30 (m, 10H), 9,5 (s, 1H); ¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 19,7 (CH₃), 26,5 (CH₃), 27,8 (CH₃), 64,3 (d, ²J_{CP} = 6,0 Hz, CH₂), 69,5 (m, CH₂), 82,7 (d, ²J_{CP} = 8,7 Hz, CH), 85,1 (C_q), 110,9 (C_q), 126,8 (d, ²J_{CP} = 14,5 Hz, CH), 127,9 (CH), 128,6 (CH), 135,6 (d, ²J_{CP} = 7,3 Hz, C_q), 202,0 (CH); ³¹P NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -1,0 (s).

DE 198 57 619 A 1

) 2,3-O-isopropyliden-2C-(ethyl-D-erythritol-4-phenyl-pyranosid-2-

2,3-O-Isopropylidene-2C-methyl-D-erythriose-4-ubenzylphosphonat (2n): 85 mg, 0,2 mmol, wurde in 3 ml. trockenem Methanol gelöst, und die Lösung wurde auf 10°C gekühlt. Natrumborhydrid, 20 mg (0,5 mmol), wurde in einer Portion zugegeben. Diese Mischung wurde 2 Stunden gerührt. Wasser (5 ml) wurde inschließend zugegossen, um überschüssiges Borhydrid zu zerstören, und die Mischung wurde mit konzentrierter Lässigsäure auf pH 5 eingestellt. Die Suspension wurde viermal mit je 10 ml Chlortetraethoxy extrahiert, und die organische Lösung wurde mit 20 ml einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung (5%) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Ausbeute: 85,5 mg (0,2 mmol, 100%); reines 21.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,27 (s, 3H), 1,50 (s, 3H), 1,36 (s, 3H), 1,89 (s, breit, 2H), 3,34 (m, 2H), 3,55 (dd, J = 4,70 Hz, J = 7,10 Hz, 1H), 4,08 (4,20 (m, 2H), 5,90 (dd, J = 1,83 Hz, J = 8,55 Hz, 4H), 7,29 (m, 10H). ¹³C NMR (103 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 22,1 (CH₃), 26,4 (CH₂), 28,1 (CH₂), 65,0 (CH₂), 65,2 (d, J_{CH} = 5,45 Hz, CH₂), 69,4 (dd, J_{CH} = 2,72 Hz, J_{CH} = 5,45 Hz, CH₂), 81,1 (d, J_{CH} = 8,18 Hz, CH₂), 81,7 (C₂), 108,5 (C₃), 126,9 (CH), 128,6 (CH), 135,6 (d, J_{CH} = 5,80 Hz, C₅). ³¹P NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0,5 (s).

(k) 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphorsäure (22)

2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythritol-4-O-benzylphosphat (21) (85,5 mg, 196 µmol) wurde in 8 ml einer Mischung, bestehend aus 4 ml Methanol und 4 ml Wasser, suspendiert. Eine katalytische Menge Palladium/Aktivkohle wurde hinzugefügt, und die Suspension wurde 20 Stunden bei Atmosphärendruck hydriert. Der Katalysator wurde durch Filtration durch einen 0,2 µm Membranfilter entfernt. Die saure Lösung (pH 2) wurde auf 70°C 60 Minuten lang erhitzt. Das Methanol wurde unter reduziertem Druck bei 40°C entfernt, und der Rückstand wurde lyophilisiert. Ausbeute: 35,3 mg (163 µmol, 83%) Rohprodukt. Die Phosphorsäure wurde in 1 ml Wasser gelöst. Diese Lösung wurde auf eine Nucleosil SB₁ HPLC-Säule aufgetragen und mit 0,5 M Ameisensäure bei einer Durchflußrate von 1 ml/min eluiert. Die Auftrennung wurde refraktometrisch verfolgt. Produkthalitige Fraktionen (Retentionsvolumen 15 ml) wurden gesammelt und lyophilisiert. Ausbeute: 18,0 mg reines 22.

¹H NMR (500 MHz, D₂O, pH 1): δ (ppm) 1,04 (s, 3H), 3,37 (d, ²J = 11,77 Hz, H_D), 3,50 (d, ²J = 11,78 Hz, H_D), 3,64 (ddd, ³J = 2,60 Hz, ³J = 8,10 Hz, H_B), 3,77 (ddd, ³J_{HP} = 6,20 Hz, ³J = 8,10 Hz, ³J = 10,80 Hz, H_B), 4,01 (ddd, ³J = 2,50 Hz, ³J_{HP} = 6,00 Hz, ³J = 10,80 Hz, H_H); ³C NMR (125 MHz, D₂O, pH 1): δ (ppm) 18,2 (C₃), 65,9 (d, 2J_{CP} = 5,14 Hz, CH_D), 66,2 (CH_D), 73,1 (d, ³J_{CH} = 7,58 Hz, CH_B), 73,8 (C₉); ³¹P NMR (101 MHz, D₂O, pH 1): δ (ppm) 3,7 (s).

Herstellungsbeispiel 2

[1-³H]-2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphorsäure (22)

2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythrose-4-dibenzylphosphat (20) 85 mg (0.2 mmol) wurde in 3 ml trockenem Methanol gelöst, und die Lösung wurde auf 0°C gekühlt.

⁴⁰ $[^3\text{H}]\text{-NaBH}_4$, 20 mg, (0,5 mmol) wurde in einer Portion zugegeben. Diese Mischung wurde 2 Stunden gerührt. Wasser (5 ml) wurde anschließend zugegeben, um überschüssiges Borhydrid zu zerstören, und die Mischung wurde mit konzentrierter Essigsäure auf pH 5 eingestellt. Die Suspension wurde viermal mit je 10 ml Chloroform extrahiert, und die organische Lösung wurde mit 20 ml einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung (5%, w/v) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Ausbeute: 85,5 mg (0,2 mmol, 100%) reines $[1\text{-}^3\text{H}]\text{-2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythritol-4-dibenzylphosphat}$ (21).

[1-³H]-2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythritol-4-dibenzylphosphat (85.5 mg, 196 µmol) wurde in 8 ml einer Mischung, bestehend aus 4 ml Methanol und 4 ml Wasser, suspendiert. Eine katalytische Menge Palladium/Aktivkohle wurde hinzugefügt, und die Suspension wurde 20 Stunden bei Atmosphärendruck hydriert. Der Katalysator wurde durch Filtration durch einen 0,2 µm Membranfilter entfernt. Die saure Lösung (pH 2) wurde auf 70°C 60 Minuten lang erhitzt. Das Methanol wurde unter reduziertem Druck bei 40°C entfernt, und der Rückstand wurde lyophilisiert. Ausbeute: 35,3 mg (163 µmol, 83%) Rohprodukt. Die Phosphorsäure wurde in 1 ml Wasser gelöst. Diese Lösung wurde auf einer Nucleosil SB₁₀ HPLC Säule aufgetragen und mit 0,5 M Ameisensäure bei einer Durchflußrate von 1 ml/min eluiert. Die Auftrennung wurde refraktometrisch verfolgt. Produkthaltige Fraktionen (Retentionsvolumen 15 ml) wurden gesammelt und lyophilisiert. Ausbeute: 18,0 mg reines [1-³H]-22.

Herstellungsbeispiel 3

[1-³H]-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphorsäure (22)

³H]-NaBH₄ (8.5 µmol, 100 mCi, 11.8 Ci/mmol) wurde in 500 µl trockenem Methanol suspendiert. 170 µl einer Lösung enthaltend 33.3 µmol 2,3-O-Isopropyliden-2C-methyl-D-erythrose-4-libenzylphosphat (20) in trockenem Methanol wurde bei Raumtemperatur in einer Portion zur Borhydrid-Suspension gegeben. Nach 1 Stunde bei Raumtemperatur wurde 1 ml Wasser zugegeben, um überschüssiges Borhydrid zu zerstören. Die entstandene Suspension wurde mit Chloroform (3 x 170 µl) extrahiert, die organischen Phasen wurden vereinigt, und das Lösungsmittel wurde ohne zu trocknen unter reduziertem Druck entfernt.

Der Rückstand wurde in 50%igem Methanol (1 ml) gelöst, eine katalytische Menge Palladium/Aktivkohle wurde hinzugefügt, und die Mischung wurde 12 Stunden (Raumtemperatur, 1 atm) hydriert. Der Katalysator wurde durch Filtration entfernt. Essigsäure (100%), 1 ml wurde zugegeben und die Mischung wurde für 30 Minuten auf 50°C erhitzt.

DE 19857619 A 1

Herstellungsbeispiel 4

Die Wiedergabe des Herstellungsbsp. 1 mit ^{13}C -Methyljodid in Schritt (a) liefert die ^{13}C -markierte Verbindung

Herrstellenksbeispiel 5

Die Wiederholung des Herstellungsbeispiels 1 mit Methyljodid-d₄ in Schritt 4 liefert die deuteriummarkierte Verbindung 22)

Hersstellungsbeispiel 6

Die Wiederholung des Herstellungsbeispiels 1 mit Kaliumcyanid-¹⁴C in Schritt (c) liefert das ¹⁴C-markierte Produkt (22).

Herstellungsbeispiel 7

[1,2-¹⁴C₂]-1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (spezifische Aktivität: 62.5 mCi/mmol) wurde biosynthetisch aus [¹⁴C]-Pyruvat (spezifische Aktivität: 150 mCi/mmol) und D,L-Glycerinaldehyd-3-phosphat hergestellt nach der Methode, die in Sprenger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) 12857-12862 beschrieben wurde.

Herstellungsbeispiel 8

$[2-^3\text{H}]$ 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (spezifische Aktivität: 5 mCi/mmol) wurde synthetisiert entsprechend Herstellungsbispiel 7 aus $[3-^3\text{H}]$ -Pyruvat (spezifische Aktivität: 72,3 Ci/mmol).

Herstellungsbeispiel 9

[1,2-¹⁴C]-1-Deoxy-D-xylulose (spezifische Aktivität: 62.5 mCi/nmol) wurde hergestellt aus [^{U-14}C]-Pyruvat mit einer spezifischen Radioaktivität von 150 mCi/nmol und D-Glycerinaldehyd unter Verwendung des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes aus *E. coli* DH5α als Katalysator. Die Ausbeute betrug 80%. Es wurde die Methode von Yokota, A. und Sasajima, K. Agric. Biol. Chem. 48, 149–158 (1994) sowie ibid 50, 2517–2524 (1986) verwendet.

Beispiele für die Plastidisolierung

Isolierungsbeispiel 1

Chromoplasten aus Capsicum annuum L.

Das Pericarp von *Capsicum annuum* (500 g Frischgewicht) wurde von Samen befreit, zerkleinert, und 500 ml Isolierungsmedium I wurde bei 4°C zugegeben. Das Isolationsmedium I enthielt die folgenden Bestandteile: 50 mM HEPES-Puffer (pH 8.0), 1 mM Dithioerythritol (77.1 mg/500 ml), 1 mM Ethylendiaminotetraessigsäure-Dinatriumsalz (186.1 mg/500 ml) und 0.4 M Saccharose (68.46 g/500 ml). Die Früchte wurden in einem Waring-Mixer (3×1 Sekunde) homogenisiert und anschließend durch eine Nylongaze (4 Lagen, 50 µm) filtriert. Zellfragmente wurden durch 5minütige Zentrifugation bei 150 g (Sorvall-Zentrifuge; GSA-Rotor) entfernt. Der Überstand wurde bei 2200 g 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Chromoplastenpellet wurde anschließend einmal mit Isolierungsmedium gewaschen. Die auf diese Weise erhaltenen Roh-Chromoplasten enthielten Protein in einer Konzentration von 10 bis 15 mg/ml [Bradford, Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)]. Diese Isolierungsmethode wurde von B. Camara, Methods Enzymol. 214, 352-365 (1993) modifiziert.

Isolierungsbeispiel 2

Chromoplasten aus *Narcissus pseudonarcissus* L.

Es wurde die Methode von Liedvogel et al. Cytobiology 12, 155-174 (1976) verwendet. Es wurden 50 Nebenkronen (ca. 50 g Frischgewicht) von *Narcissus pseudonarcissus* verwendet. 250 ml kaltes Isolierungsmedium 2 wurden zugefügt [67 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.5), 5 mM MgCl₂ (254,1 mg/250 ml), 0,2% Polyvinylpyrrolidon K 90 (0,5 g/250 ml), 0,74 M Saccharose (63,3 g/250 ml)]. Die Mischung wurde in einem Waring-Mixer (3 x 1 Sekunde) homogenisiert. Nach Filtration des Homogenats durch eine Nylongaze (3 Lagen, 50 µm) und Zentrifugation bei 1400 g für 5 min (Eppendorf Zentrifuge) wurde nach einer erneuten 20minütigen Zentrifugation des Überstandes bei 16500 g (Sorval-Zentrifuge, ESA-Rotor) ein Chromoplastenpellet erhalten. Das Pellet wurde in einem Puffer (1-2 ml) mit der folgenden Zusammensetzung resuspendiert: 50% (w/v) Saccharose in 67 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, und in ein transparentes Zentrifugerröhrchen überführt. Es wurden 40%ige, 30%ige und 15%ige (w/v) Saccharoselösungen im gleichen Puffer hergestellt, und je 1 l einer jeden Lösung wurde als getrennte Schicht über die Flüssigkeiten im transparenten Zentrifugerröhrchen gegeben. Nach 60minütiger Zentrifugation bei 50000 g (Beckmann, SW 28-Rotor) klarteten die Chromoplasten an; bildeten zwei Bänder zwischen den Phasengrenzflächen der 40/30%igen und 30/15%igen Saccharoselösungen. Die Chromoplasten wurden vorsichtig mit Hilfe einer Pipette aus dem Saccharosegradienten entfernt, und mit Puffer bis zu einer Saccharoseendkonzentration von 15% (w/v) versuppt, damit die Plasmagradienten entfernt, und mit Puffer bis zu einer Saccharoseendkonzentration von 15% (w/v) versuppt, damit die Plasmagradienten entfernt.

DE 19857619 A1

stufen klare, homogene Zentrifugation bei 16500 g erzielen. Ss-34-R kann pelletiert werden können. Ansonsten werden sie in Inkubationspuffer (140 mM TRIS-HCl, pH 7.2, 1 mM MgCl₂, 2 mM Dithioerythrit) resuspendiert. Die Protein-Konzentration wird nach der Methode von Bradford bestimmt.

Isonierungsbeispiel 3

Chloroplasten

Für die Isolierung der Chloroplasten nach der Methode im Isolierungsbeispiel 1 wurden die grünen Fruchte von Capsicum annuum L. verwendet. Das Pfeffer wurde im Gegensatz dazu durch 2minütige Zentrifugation bei 2200 g erhalten (Sorvall, USA-Rotor).

Auf gleiche Weise wurden Chloroplasten aus *Avena sativa* (250 g Primärblätter) mit der obengenannten Methode isoliert. Die Pflanzen wuchsen 7 Tage lang auf Vermiculit-Granulat (Exposition: 1400 lx, 25 °C, 50-60% RH).

Mit derselben Methode wurden auch Chloroplasten aus *Lactuca capitata* var. *capitata* L., *Spinacia oleracea* L., *Secale cereale* L., *Brassica oleracea* subsp. *oleracea* var. *italica* L., aus der Blütenknospe, *Oryza sativa* und *Zea mays* isoliert.

Screening-Beispiele

Screening-Beispiel 1:

Schritt A: Test ohne Inhibitor

Es wurde die Chromoplasten aus *Capsicum annuum* L. verwendet. Die Inkubation wurde in einem Eppendorf Reaktionsgefäß bei 30°C während 15 h durchgeführt. Das Gesamtvolumen der Enzymszusammensetzung betrug 500 µl. Es setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 100 µM HEPES-Puffer (pH 7,6), 2 mM MnCl₂ (1 µmol), 10 mM MgCl₂ (5 µmol), 2 nM NADPH (1 µmol), 0,1 µCi [³²P]-1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (1,6 nmol; 342,4 ng).

Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe der Chromoplastensuspension (ca. 2 mg Protein) gestartet. Für Kontrolltests wurde die entsprechende Menge destillierten Wassers zugegeben.

Um zu demonstrieren, daß die radioaktiv markierten Substrate in Carotinoide und andere lipophile Verbindungen eingebaut wurden, wurde die Enzymzusammensetzung zweimal mit je 1 ml Chloroform extrahiert, und die vereinigten Chloroformphasen wurden mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Bachhofer) konzentriert. Das Volumen wurde auf 300 µl gebracht, und eine 10 µl-Portion davon wurde zur Bestimmung der Radioaktivität in der organischen Phase verwendet (Szintillationszähler Automatic Counter LS6500, Beckmann).

Zur Demonstration der Radioaktivität in einer bestimmten Carotinoidfraktion wurde die organische Phase mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie getrennt. Die Radioaktivität wurde mit Hilfe eines "Bio-Imaging Analyzers" (BAS-1500, Fujifilm) oder eines "Radio-Dünnschicht-Scanners" (Automatic TLC Linear Analyzer, Berthold) bestimmt. Um Radikaktivitätswerte der gesuchten Terpenoide in der organischen Phase oder des β -Carotins zu erhalten, wurde der Prozentsatz der radioaktiv markierten Vorstufe, die in Terpenoide oder β -Caretin umgewandelt wurde, berechnet. Das Ergebnis ist 14% für alle Terpenoide oder 10% für β -Carotin.

Schritt B: Test mit Inhibitoren

Die Inkubation von Schritt A wurde nach Zugabe steigender Mengen an 3-(N-Formyl-N-hydroxyamino)propylphosphonsäure Mononatriumsalz (F1) [hergestellt nach Ohler, E. und Kanzler, S. Synthesis 539–543 (1995); Yazawa, H. und Goto, S., Tetrahedron Letters 26, 3703–3706 (1985)] oder 3-(N-hydroxyamino)propylphosphonsäure Mononatriumsalz (F2) [hergestellt nach Öhler, E. und Kanzler, S. Synthesis 539–543 (1995)] wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt. Das in Schritt A erhaltene Ergebnis wurde als Bezugswert in Tabelle 1 auf 100 gesetzt.

Tafel 1

| Inhibitorkonzentration (μM) | Umwandlung in Terpenoide (%) | |
|---|---------------------------------|--------------|
| | Inhibitor F1 | Inhibitor F2 |
| 0 | 100 | 100 |
| 0,1 | 88 | 100 |
| 1 | 66 | 100 |
| 3 | 45 | 100 |
| 5 | 30 | 100 |
| 10 | 6 | 100 |
| 100 | 3 | 100 |
| 1000 | 0 | 100 |

Die Ergebnisse zeigen, daß das Screening-Versfahren empfindlich ist, sowohl für den Inhibitornachweis als auch für die Unterscheidung zwischen Inhibitor und Nicht-Inhibitor.

Screening-Beispiel 2

Das Screening-Beispiel 1 wird wiederholt mit der Ausnahme, daß ^{14}C -markierte 1-Deoxy-D-xylulose oder ^3H -markiertes 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat anstelle von ^{14}C -markiertem 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat verwendet wird. Die Ergebnisse ohne Inhibitor sind analog, wobei der Einbau von 1-Deoxy-D-xylulose ungefähr 10% des Einbaus von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat beträgt. Die Ergebnisse mit Inhibitor sind die gleichen, wie im Screening-Beispiel 1 für 1-Deoxy-D-xylulose aber für 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat wurde keine Inhibition beobachtet.

Screening-Beispiel 3

Das Screening-Beispiel 1 wird mit Chromoplasten aus *Narcissus pseudonarcissus* L. oder mit Chloroplasten aus *Capsicum annuum* L., *Avena sativa* L., *Lactuca capitata* var. *capitata* L., *Spinacia oleracea* L., *Secale cereale* L., *Brassica oleracea*, supsp. *oleracea* var. *italica* L., *Oryza sativa*, *Zea mays* wiederholt. Hiermit wurden analoge Ergebnisse erhalten.

Screening Beispiel 4

Das Screening-Beispiel 1 wird mit [$1-^{14}\text{C}$] Isopentenylpyrophosphat ($0.1 \mu\text{Ci}, 1.8 \text{ nmol}$) wiederholt. Es konnte gezeigt werden, daß weder F1 noch F2 eine Inhibition zeigten.

Patentansprüche

1. Eine Methode zur Ermittlung von Inhibition wenigstens eines Enzyms in der Biosynthese von Terpenoiden über 50
1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat in Pflanzen, welche die folgende Schritte umfaßt:
 - (a) Herstellung einer Suspension aus Zellen oder Plastiden eines plastidhaltigen Organismus in einem Kulturmedium, welches zur Unterstützung des Metabolismus in besagten Zellen oder Plastiden mindestens bis zum Ausmaß des besagten Biosyntheseweges dient.
 - (b1) Zugabe einer definierten Menge einer ^{13}C -, ^{14}C -, ^3H - oder ^2H -markierten, biochemischen Vorstufe zur Erzeugung von Terpenoiden über besagten Biosyntheseweg,
 - (c1) Inkubation der in Schritt (b1) erhaltenen Mischung für eine bestimmte Zeitspanne bei einer definierten Temperatur,
 - (d1) Abtrennung einer Fraktion aus der in Schritt (c1) erhaltenen Mischung, welche ein Produkt oder Zwischenprodukt des besagten Biosyntheseweges unterhalb von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat enthält,
 - (e1) Nachweis und Bestimmung der Konzentration eines oder mehrerer markierter Produkte in der besagten Fraktion, welche in Schritt (d1) erhalten wurde,
 - (b2) Wiederholung des Schrittes (b1) nach der Zugabe einer definierten Menge einer chemischen Testsubstanz unter unsonstigen identischen Bedingungen,
 - (c2) bis (e2) Wiederholung der Schritte (c1) bis (e1) mit der in Schritt (b2) erhaltenen Mischung unter denselben Bedingungen wie in den Schritten (c1) bis (e1) und
 - (f) Nachweis der Hemmung wenigstens eines Enzyms im besagten Biosyntheseweg durch die Beobachtung, ob die Konzentration eines oder mehrerer Produkte, die in Schritt (e1) bestimmt wurde höher ist als die Kon-

DE 198 57 619 A 1

- zentration eines oder mehrerer Produkte, die in Schritt (e2) bestimmt wurde.
- 2. Eine Methode gemäß Anspruch 1, in welcher der plastidhärtige Organismus eine monoenzytielle einkettelblattzelle oder die tyledone zweikeimblättrige Pflanze ist.
 - 3. Eine Methode gemäß Anspruch 1, in welcher das Plastid ein Chlormoplast oder Chloroplast ist.
 - 4. Eine Methode gemäß Anspruch 1, in welcher die biochemische Verstufe aus einer Gruppe, bestehend aus 1-Deoxy-D-xylulose, 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat und 2C-Methyl-D-erythritol, 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat und 2C-Methyl-D-erythritol-4-pyrophosphat gewählt wurde.
 - 5. Eine Methode gemäß Anspruch 1, in der eine Extraktion mit einem lipophilen organischen Lösungsmittel für die Abtrennung in den Schritten (d1) und (d2) verwendet wird.
 - 6. Eine Methode gemäß Anspruch 1, in der die folgenden zusätzlichen Schritte ausgeführt werden:
 - (g1) Zugabe einer definierten Menge eines ^{14}C , ^{13}C , ^{3}H - oder ^2H -markierten Isopentenylpyrophosphates zur Suspension aus Schritt (a).
 - (e3) bis (e5) Wiederholung der Schritte (e1) bis (e1) mit der in Schritt (g1) erhaltenen Mischung.
 - (g2) Wiederholung des Schrittes (g1) nach Zugabe einer definierten Menge eines, in Schritt (f) nachgewiesenen Inhibitors.
 - (h) Nachweis der Anwesenheit einer Inhibition eines Enzyms im Biosyntheseweg unterhalb von Isopentenylpyrophosphat durch besagten Inhibitor.
 - 7. Eine Methode zur Wachstumshemmung von Pflanzen durch Behandlung mit einer chemischen Verbindung, welche aus einer Klasse chemischer Verbindungen stammt, die im Test gemäß Anspruch 1 eine Inhibition des Biosyntheseweges zu Terpenoiden über 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat aufweisen.
 - 8. Eine Methode zur Hemmung eines, in Chloroplasten von Pflanzen vorhandenen Enzyms des Biosyntheseweges zu Terpenoiden über 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat durch Behandlung mit einer chemischen Verbindung, welche aus einer Klasse chemischer Verbindungen stammt, die im Test gemäß Anspruch 1 eine Inhibition des Biosyntheseweges zu Terpenoiden über 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat aufweisen.
 - 9. Eine Methode gemäß den Ansprüchen 7 oder 8, in welcher die Behandlung mit einer chemischen Verbindung durchgeführt wird, die im Test gemäß Anspruch 6 keine Inhibition aufweist.

30

35

40

45

50

55

(e)

65